

POLIMORFISMO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
Phaseolus vulgaris DESENVOLVIDOS A PARTIR DE REGIÕES ALVOS
HOMÓLOGAS E LIGADAS À GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATOIDE EM
Glycine max

JESSICA CAROLINA FURLAN
Eng. Agrônoma / Mestranda Proteção de Plantas

JESSICA CAROLINA FURLAN

**POLIMORFISMO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
Phaseolus vulgaris DESENVOLVIDOS A PARTIR DE REGIÕES ALVOS
HOMÓLOGAS LIGADAS À GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATOIDE EM
*Glycine max***

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE em Proteção de Plantas.

Urutaí – GO
2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Fp Furlan, Jessica Carolina
POLIMORFISMO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES
DE Phaseolus vulgaris DESENVOLVIDOS A PARTIR DE
REGIÕES ALVOS HOMÓLOGAS E LIGADAS À GENES DE
RESISTÊNCIA A NEMATOIDE EM Glycine max / Jessica
Carolina Furlan; orientador Ivandilson Pessoa Pinto
de Menezes. -- Urutaí, 2020.
21 p.

Dissertação (em Proteção de Plantas) -- Instituto
Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

1. Feijão comum. 2. Seleção assistida. 3.
Marcadores EST-SSR. 4. Meloidogyne spp.. I. Menezes,
Ivandilson Pessoa Pinto de , orient. II. Título.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: | |

Nome Completo do Autor:

Matrícula:

Título do Trabalho:

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: ___/___/___

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

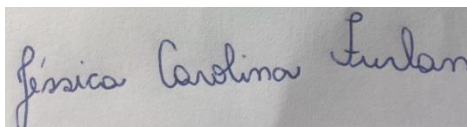
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutai, 13/04/2020.
Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO
DE PLANTAS

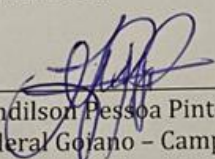
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

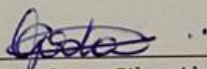
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POLIMORFISMO DE NOVOS
MARCADORES MICROSSATÉLITES DE *Phaseolus vulgaris*
DESENVOLVIDOS A PARTIR DE REGIÕES ALVOS HOMÓLOGAS
LIGADAS À GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATOIDE EM *Glycine*
max.

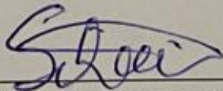
AUTORA: Jessica Carolina Furlan

Dissertação defendida e aprovada como parte das exigências
para obtenção do título de Mestra em Proteção de Plantas.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes (orientador)
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí


Prof.ª Dra. Gleina Costa Silva Alves
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí


Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

Urutaí - GO, 27 de fevereiro de 2020



ppgpp.urt@ifgoiano.edu.br



(61) 3465-1012

RODOVIA GERALDO S. NASCIMENTO,
KM 2,5

CEP 75790-000, URUTAÍ – GO
www.ifgoiano.edu.br/urutai



**INSTITUTO
FEDERAL**
Goiano

DEDICATÓRIA

**Aos meus avós, pais e irmãzinha,
por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que foi pela minha fé que tive forças para prosseguir e não desistir de nada que me proponho a fazer.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nos estudos e na vida.

À minha irmã, pelo apoio e dedicação.

Ao meu orientador, professor Dr. Ivandilson Menezes, por sempre me apoiar oferecendo palavras de incentivo e excelência no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo com o meu desenvolvimento intelectual.

A todos os professores do programa de Proteção de Plantas, especialmente ao professor Dr. Anderson e professora Dra. Gleina Costa, pelos momentos de diálogo e crescimento intelectual

A empresa Fortaleza Agrícola LTDA, por me liberarem sempre que possível para o desenvolvimento dos trabalhos referentes ao mestrado.

A minha grande amiga Maria Juliana, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos, por me proporcionarem momentos de lazer e ajudarem com a minha saúde mental.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí /GO, por oferecerem toda a infraestrutura necessária para obtenção de conhecimentos e a oportunidade de conquistar o sonho de ser mestre.

A todos os colaboradores do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí / GO.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRAT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1.GERAIS.....	4
2.2.ESPECÍFICOS.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1.Amostra de plantas.....	5
3.2.Extração de DNA.....	6
3.3.Otimização dos marcadores SSR desenvolvidos.....	7
3.4.Caracterização do polimorfismo dos marcadores SSR.....	8
3.5.Análise dos dados.....	9
3.6.Ensaio experimentais de fenotipagem.....	9
3.7.Instalação do ensaio de fenotipagem e delineamento experimental.....	9
3.8.Extração do inóculo.....	9
3.9.Avaliação.....	10
3.10.Análise dos dados.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1.Ensaio experimentais de genotipagem.....	10
4.2.Ensaio experimentais de fenotipagem.....	15
5. CONCLUSÕES	17
6. REFERÊNCIAS	18

RESUMO

As adversidades as quais o feijoeiro tem sido exposto contribuem para elevada diversidade encontrada na cultura, possibilitando a seleção. Aliados às alterações de paisagens para plantio, surgem os mais variados problemas fitossanitários, a exemplo dos nematoides de galhas. Uma importante forma de manejo dos nematoides é o uso de variedades resistentes, os marcadores de DNA constituem ferramenta biotecnológica de valoração rápida que pode ajudar na prospecção e uso de recursos genéticos disponíveis. Tivemos como objetivo caracterizar o polimorfismo de marcadores de microssatélites candidatos em *P. vulgaris* associados a genes que conferem resistência à nematoide. O desenvolvimento experimental foi no laboratório e casa de vegetação localizadas no IF Goiano – Campus Urutaí. Vinte e seis cultivares de feijão pertencentes ao germoplasma da Embrapa foram genotipadas para nove marcadores microssatélites e fenotipadas quanto ao comportamento de hospedabilidade a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. O DNA gênômico foi obtido a partir de folhas jovens usando o método de CTAB 2%. As PCRs foram realizadas de acordo com fabricante dos reagentes Invitrogen. Os fragmentos de PCRs foram separados por eletroforese e corados com nitrato de prata. O delineamento dos ensaios de fenotipagem utilizados foram realizados em 26 genótipos, sendo inteiramente casualizados com cinco repetições. A inoculação foi realizada 7 dias após a germinação, com uma suspensão de 3000 ovos de juvenis de segundo estágio. As avaliações ocorreram 45 dias após a inoculação, conforme o método de Hartman. As plantas foram classificadas conforme o nível de resistência e tolerância. Para genotipagem foram observados polimorfismo, porém ainda não podemos afirmar que essa marcação genética corresponde a genes de resistência, tendo em vista que os bioensaios de fenotipagem não apresentou variação quanto a resistência e susceptibilidade ao nematoide *M. incognita*. Por fim, seis novos marcadores microssatélites de *P. vulgaris* heterólogos para regiões alvos de genes que conferem resistência genética a nematoide em *Glycine max* estão disponíveis para validação.

Palavras – chave: Feijão comum, Seleção assistida, Marcadores EST-SSR, *Meloidogyne* ssp.

ABSTRACT

The adversities to which the bean has been exposed contribute to the high diversity found in the crop, making selection possible. Allied to the alteration of landscapes for planting, the most varied phytosanitary problems arise, like the gall nematodes. An important form of nematode management is the use of resistant varieties, the DNA markers are a rapidly valuing biotechnological tool that can help in the exploration and use of available genetic resources. We aimed to characterize the polymorphism of candidate microsatellite markers in *P. vulgaris* associated with genes that confer resistance to the nematode. The experimental development took place in the laboratory and greenhouse located at the IF Goiano - Campus Urutaí. Twenty-six bean cultivars belonging to Embrapa's germplasm were genotyped for nine microsatellite markers and phenotyped as to the behavior of hostility to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. Genomic DNA was obtained from young leaves using the CTAB 2% method. PCRs were performed according to the reagent manufacturer Invitrogen. The PCR fragments were separated by electrophoresis and stained with silver nitrate. The design of the phenotyping assays used were carried out in 26 genotypes, being completely randomized with five replications. The inoculation was carried out 7 days after germination, with a suspension of 3000 eggs of second stage juveniles. The evaluations took place 45 days after inoculation, according to the Hartman method. The plants were classified according to the level of resistance and tolerance. For genotyping, polymorphism was observed, but we cannot yet say that this genetic marking corresponds to resistance genes, considering that the phenotyping bioassays did not show any variation in resistance and susceptibility to the *M. incognita* nematode. Finally, six new microsatellite markers of *P. vulgaris* heterologous to target regions of genes that confer genetic resistance to nematodes in *Glycine max* are available for validation.

Keywords: Common beans, Assisted selection, EST-SSR markers, *Meloidogyne* ssp.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas representam uma das principais fontes de alimento do mundo (FAO 2020), com cerca de 80 espécie de sementes secas comestíveis amplamente cultivadas (FAO 2020). Dentre estas espécies inclui o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), considerado a leguminosa mais importante para o consumo direto no mundo, cultivada em 113 países e de grande relevância para segurança alimentar e agricultura sustentável (FAO 2020). Em termos nutricionais, o feijão é considerado uma excelente fonte de proteína, além de possuir um bom conteúdo de ferro, fósforo, magnésio, manganês, e em escala menor de zinco, cobre e cálcio.

Seis países concentram 61% da produção comercial do mundo, sendo Myanmar é o maior produtor mundial dessa leguminosa, seguido da Índia, Brasil, China, EUA e México (COELHO, 2018). Segundo Ruas (2020) o Brasil se destaca como maior produtor e consumidor do Mercosul, com participação superior a 90% na produção e no consumo. De acordo com BRASIL (2019) 42% da produção nacional de feijão é proveniente da agricultura familiar, ocupando diferentes ambientes e sistemas de consórcio com outras culturas com baixo uso de tecnologia. Logo, a produção de tecnologia que contribua com a diminuição dos custos e aumento da produtividade direciona a cadeia produtiva do feijoeiro para manutenção da autossuficiência no país e aumentam as possibilidades para abertura do mercado internacional.

A expansão agrícola representa uma das principais causas da alteração de paisagens naturais (MMA, 2018; FERRAZ JUNIOR, 2004). As modificações do ambiente para plantio têm exigido cada vez mais estratégias de controle, manejo e sistemas de produção aperfeiçoados, principalmente, devido ao aumento e surgimento de novos problemas fitossanitários (GAZZIERO, 2015). Essas alterações contribuíram para a introdução de patógenos emergentes e de doenças que não eram consideradas problemas para várias culturas e passaram a merecer destaque.

Um dos principais fatores que diminuem a produtividade do feijoeiro são as incidências de doenças. O feijão comum (*P. vulgares*), é hospedeiro de diversas doenças fúngicas, tais como a ferrugem, antracnose, mancha angular, mancha alva, mela; doenças bacterianas com destaque para crestamento bacteriano comum, murcha de *Curtobacterium*; doenças viróticas, como mosaico comum e mosaico dourado; e doenças que tem como agentes causadores os nematoides (EMBRAPA, 2018).

Entre os nematoides podemos destacar como problema o *Pratylenchus brachyurus* e o *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. Estas espécies são nematoides de raiz, sendo frequentes em todos os tipos de solo, porém têm maior facilidade de locomoção em solos arenosos, pois os mesmos possuem alta permeabilidade. Os nematoides são fitoparasitas polípagos e podem sobreviver por períodos indeterminados no solo (WENDLAND et al, 2018). O *P. brachyurus*, conhecido popularmente como nematoide das lesões radiculares, este nome foi dado pelo modo

de alimentação deste fitonematoide. O nematoide das lesões possui alta distribuição geográfica além de ser hospedeiro de diversas culturas. Devido a sua forma de alimentação que causam lesões nas raízes, sendo porta de entrada para outras doenças (SILVEIRA & RAVA, 2004).

O *Meloidogyne* spp., mais conhecido como nematoide de galha, possui duas espécies que merecem atenção, que são o *M. javanica* e *M. incognita*. Os mesmos se alimentam na fase juvenil em segundo estágio (J2), sua penetração se dá pela coifa da raiz em crescimento e se movem até localizarem uma região de alimentação na qual ficam fixos. Através das secreções esofagianas liberadas durante a sua alimentação, ocorre a formação das células gigantes, ocasionando a hiperplasia e hipertrofia celulares, levando a uma menor absorção de água e nutrientes. Como sintomatologia das plantas, observa-se nanismo, clorose, murchamento e desenvolvimento anormal das raízes, contribuindo de maneira negativa na produtividade (SALGADO, 2007). Esses impactos negativos na produtividade e no desenvolvimento da planta deve-se, basicamente, ao fato dos nematoides atuarem como um dreno, captando os nutrientes da planta para seu próprio desenvolvimento (CAROMEL; GEBHARD, 2011).

O controle biológico desses patógenos tem se destacado como uma estratégia com potencial de ser utilizado no manejo de nematoides, sendo uma das principais ferramentas para a diminuição do uso de nematicidas sintéticos, produtos caros e altamente tóxicos ao homem e ao ambiente (BETTIOL et al., 2014). Dentre outras medidas de manejo adotadas para controlar espécies de *Meloidogyne* ssp. estão as preventivas, a exemplo da limpeza de máquinas e implementos agrícolas, utilização de plantas antagonistas (GONTIJO, 2017); assim, como a rotação de culturas, técnica que é vista como desinteressante por parte do agricultor, especialmente por ser obrigado a cultivar suas áreas com culturas que não lhe darão retorno.

O controle de nematoides com base na seleção de genótipos com resistência genética tem sido promissor não apenas na cultura do feijão (YOKOMA, 2007), mas em outras culturas agrícolas, a exemplo da soja (MATSUO et al., 2012), algodão (SUASSUNA, 2006) e milho (RIBEIRO et al., 2002). Logo, práticas de manejo de nematoides aliadas a plantas com resistência genética podem mitigar o uso frequente de produtos químicos, fomentando práticas de uma agricultura sustentável. CARVALHO et al. (2016) destacam que o uso de plantas com resistência a nematoides contribui efetivamente na redução de perdas em área infestadas, com possibilidade do incremento da produtividade e, conseqüentemente, redução de custos de produção, garantindo maior competitividade e sustentabilidade.

Embora exista fontes de variação genética de resistência à *Meloidogyne* spp. em leguminosas demonstradas em algumas publicações (CARNEIRO et al., 1992; WALBER et al., 2003), ainda são pouco exploradas na cultura do feijoeiro comum. Esta lacuna de conhecimento ressalta a importância na produção de informação e no desenvolvimento de ferramentas que ajudem na prospecção de genes para tal propósito. Nesse contexto, os marcadores de DNA constituem uma ferramenta biotecnológica de valoração rápida que ajuda no delineamento de

estratégias de uso dos recursos genéticos disponíveis. Para este fim, os marcadores microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR) têm sido largamente utilizados, devido a sua ampla distribuição no genoma, hipervariabilidade e facilidade de detecção de polimorfismo (CARDOSO et al., 2013; MÜLLER et al., 2014).

Entre os marcadores SSR, aqueles presentes em sequências expressas (*Expressed Sequence Tag* - EST) têm-se destacado devido a sua forte ligação à genes de função conhecida, alto nível de transferibilidade entre espécies relacionadas e baixo custo para desenvolvimento (ZHANG et al., 2014). Aliado aos recentes avanços de sequenciamento genômico total, constata-se um considerável aumento na disponibilidade de EST em banco de dados públicos, facilitando os estudos de homologia genética entre espécies próximas filogeneticamente (SCHMUTZ et al., 2014), a exemplo das espécies de *P. vulgaris* e *Glycine max*. Neste sentido, VIEIRA et al. (2016) conseguiram desenvolver 15 candidatos à marcadores SSR para feijão comum a partir de genes que conferem resistência a nematoide em soja. Entre estes marcadores, nove foram selecionados e otimizados para suas condições de amplificação via PCR (CARVALHO, 2018). Entretanto esses marcadores não foram caracterizados ainda quanto ao seu poder de informação genética.

Portanto, este trabalho foi desenvolvido sobre a hipótese que os marcadores SSR candidatos a conferir resistência à nematoide em feijão comum apresentam um expressivo poder de informação polimórfica no germoplasma de feijão comum. Acredita-se que o produto a ser gerado com este trabalho poderá ser usado como ferramenta preventiva de identificação de polimorfismos relacionados ao comportamento fenotípico do feijoeiro causado pelo *Meloidogyne* ssp.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Gerar informação genética para nove marcadores microssatélites desenvolvidos para regiões genômicas ligadas a genes de resistência a *Meloidogyne* ssp. em *Phaseolus vulgaris*, como medida de conservação e uso de seus recursos genéticos.

2.2. Específicos

Analisar o padrão genético de amplificação dos *primers* desenvolvidos;

Caracterizar o conteúdo de informação genética dos *primers* desenvolvidos em um germoplasmas de 26 cultivares de *P. vulgaris*;

Avaliar a relação genética de discriminação de 26 cultivares de *P. vulgaris* através dos marcadores SSR desenvolvidos e polimórficos;

Caracterizar fenotipicamente a reação das 26 cultivares de feijão, descritas como resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis ao *Meloidogyne incognita*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos e a análises dos resultados foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular (LaGeM) e de Nematologia Agrícola, situado no Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, GO.

3.1 Amostras de plantas

Os 26 acessos de *Phaseolus vulgaris* foram obtidos em parceria com o laboratório de fitopatologia do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (Tabela 1)

Três sementes de cada um dos 26 acessos de feijão comum foram semeadas, separadamente, em sacos plásticos de 500 mL com solo previamente preparado na proporção de 2:1 de areia e argila. Folhas jovens foram coletadas e acondicionadas em papel alumínio e gelo, em seguida, foram mantidas a -20 °C até o momento da extração do DNA genômico.

Tabela 1. Indivíduos utilizados para a análise de polimorfismo dos *primers* microssatélites desenvolvidos.

Indivíduos	Espécie	Acessos	Instituição	Origem
1	<i>P. vulgaris</i>	ANFC9	Agro Norte Sementes	Mesoamericano
2	<i>P. vulgaris</i>	Bayer		
3	<i>P. vulgaris</i>	BRSMG Uirapuru	IAPAR	Mesoamericano
4	<i>P. vulgaris</i>	IPR Campos Gerais	IAPAR	Mesoamericano
5	<i>P. vulgaris</i>	Comercial All Tech	Alltech	
6	<i>P. vulgaris</i>	BRS Estilo	Embrapa	Mesoamericano
7	<i>P. vulgaris</i>	BRSMG UAI	Embrapa/UFLA/EPAMIG/UFV	Mesoamericano
8	<i>P. vulgaris</i>	PF		
9	<i>P. vulgaris</i>	Master 1		
10	<i>P. vulgaris</i>	Máster 2		

11	<i>P. vulgaris</i>	CIO		
12	<i>P. vulgaris</i>	DRK	Embrapa	Mesoamericano
13	<i>P. vulgaris</i>	All Tech		
14	<i>P. vulgaris</i>	BRS FC402	Embrapa	Mesoamericano
15	<i>P. vulgaris</i>	IAC Sintonia	IAC	Mesoamericano
16	<i>P. vulgaris</i>	BRS FC104	Embrapa	Mesoamericano
17	<i>P. vulgaris</i>	Comercial Master	Embrapa	Mesoamericano
18	<i>P. vulgaris</i>	Perola	Embrapa	Mesoamericano
19	<i>P. vulgaris</i>	IAC Tigre	IAC	Mesoamericano
20	<i>P. vulgaris</i>	Polaco	IAC	Mesoamericano
21	<i>P. vulgaris</i>	BRSNGMadreperola	Embrapa/UFV/UFLA	Mesoamericano
22	<i>P. vulgaris</i>	Jest		
23	<i>P. vulgaris</i>	IAC Milênio	IAC	Mesoamericano
24	<i>P. vulgaris</i>	BRS Esteio	Embrapa	Mesoamericano
25	<i>P. vulgaris</i>	IPR Tangara	IAPAR	Mesoamericano
26	<i>P. vulgaris</i>	IPR Tuiuiu	IAPAR	Mesoamericano

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de folhas jovens de feijoeiro comum através do método de CTAB 2% (DOYLE ; DOYLE, 1990) com modificação. A modificação foi relacionada ao

modo de maceração, no qual as amostras do tecido foliar foram trituradas manualmente em tubos de 2,0 ml, separadamente para cada acesso, com esfera de inox (6 mm) em nitrogênio líquido (N₂). Para tal, os tubos foram congelados em N₂ e transferidos para um rack com tampa, que através de movimentos fortes unidirecionais (para cima e para baixo) por 30 segundos a amostra de tecido foliar foi macerada. O DNA extraído foi ressuspensionado em 100 µl de solução TE-RNAase (Tris HCL 1 M pH=8,0, EDTA à 0,5 M pH=8,0 e RNAse à 10 mg/mL).

Alíquotas do DNA genômico extraído foram quantificadas em eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com brometo de etídeo (0,5 µL/mL), por meio de comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas de DNA em relação ao marcador de massa molecular conhecida de DNA fago λ (50, 100 e 200 ng/µL). Em seguida, o DNA genômico foi diluído para concentração final e de uso de 10 ng/µL.

3.3 Otimização dos marcadores SSR desenvolvidos

A partir dos 26 pares de *primers* desenvolvidos a partir de regiões genômicas de *P. vulgaris* heterólogas a seis genes identificados em soja (EREBP; Ext1; Ext2; Rhg1; Rhg4; Rmi1) que são associados à genes de resistência ao nematoide da galha. Selecionou-se nove pares de *primers* para a realização do experimento (VIEIRA et al., 2016) (Tabela 2). Foi selecionado no máximo dois pares de *primers* por gene identificado com motivos de repetições perfeitos ou compostos maiores que três.

Tabela 2: Temperatura de anelamento otimizada e motivo de repetição de nove *primers* SSR candidatos ligados a genes que conferem resistência a *Meloidogyne* ssp. selecionados para a caracterização genética de polimorfismos em *P. vulgaris*.

Primer	Gene	Motivo de repetição
IFRT02	EREBP	(ATT)6
IFRT03	EREBP	(CTT)4
IFRT06	Ext1	(CGG)3(CTA)6(CCG)4
IFRT09	Ext1	(AT)5
IFRT11	Ext2	(TAC)9(CCA)3(CTA)3
IFRT15	Ext2	(ATT)5
IFRT20	Rhg1	(TC)13

IFRT25	Rhg4	(GAA) ⁴
IFRT26	Rmi1	(CGA) ⁴

Para a realização dos testes de otimização e amplificação via PCR, utilizou-se apenas um genótipo escolhido aleatório entre as 26 cultivares do germoplasma caracterizado neste estudo. As reações de PCR foram produzidas para volume final de 12 µL, contendo 20 ng de DNA, 1x de tampão (50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 1,5 mM de MgCl₂), 0,3 mM de cada *primer* (forward e reverse), 0,25 mM de cada dNTP e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador com as seguintes condições de temperatura e etapas: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos com etapas de desnaturação (1 minuto a 94 °C), anelamento (1 minuto, temperatura de teste de gradiente) e extensão (1 minuto a 72 °C); e por fim, uma etapa de extensão final de 72 °C por mais 7 minutos.

Foi estabelecido no teste gradiente 12 TAs para cada par de *primer* com variação de 0,5 °C para mais e para menos a partir da temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer* conforme a programação disponível no termociclador *GeneMate Series Advance*. Por exemplo, as temperaturas de otimização testadas para os *primers* com T_m= 55 °C foram: T1= 50°C, T2= 50,5°C, T3= 51,2°C, T4= 52,2°C, T5= 53,4°C, T6= 54,6°C, T7= 55,8°C, T8= 56,9°C, T9= 58,0°C, T10= 59,0°C, T11= 59,4°C, T12= 60,0°C. O produto de cada PCR foi separado por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 4% e corado com nitrato de prata de acordo com o trabalho realizado por CRESTE et al. (2001). Após a revelação e secagem do gel, o mesmo foi analisado sob luz branca, permitindo a identificação dos genótipos e a sua qualidade no que diz respeito à nitidez das bandas e a existência ou ausência de ampliações inespecíficas. Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados em cada loco SSR foram estimados usando marcador de peso molecular padrão de 50 pb.

3.4 Caracterização do polimorfismo dos marcadores SSR

Um germoplasma de 26 acessos diferentes em “bulk” com cinco repetições, separadamente, foi utilizado para a caracterização do polimorfismo dos nove marcadores SSR selecionados. O “bulk” foi usado como controle na detecção da heterogeneidade de cada acesso. As condições de PCRs, eletroforese, coloração e genotipagem foram as mesmas descritas anteriormente, com exceção da TA em gradiente, tendo em vista que foi determinado a TA ótima para cada *primer* (Tabela 2).

3.5 Análise dos dados moleculares

Os fragmentos de microssatélites amplificados ou alelos de cada *loci* foram estimados, separadamente, através de um modelo de regressão de melhor ajuste baseado na distância de migração em centímetro e o tamanho padrão de fragmentos de DNA obtidos no marcador padrão de 50 pb usando o programa *Table curve 2 D* (STACON, 2010). Os descritores de informação genética dos *loci* SSR foram estimados usando o software GenAEx 6.5 (PEAKALL ; SMOUSE, 2012), com as seguintes estatísticas: números de alelos em cada locos amplificado (N_A), frequência de cada alelo por loco (f_A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (H_E), índice de fixação (F) e a probabilidade de identidade (PI) e exclusão (PE). A distância entre os indivíduos foi calculada com base na proporção de alelos comuns (BOWCOCK et al., 1994). A matriz de distância obtida foi usada para a construção de dendograma por meio do programa MEGA4.

3.6 Ensaios experimentais de fenotipagem

O ensaio foi realizado em condições de casa de vegetação pertencente ao Instituto Federal Goiano Câmpus Urutaí, Goiás. Neste foram avaliados os genótipos de feijão comum pertencente a diferentes Instituições (Tabela 1), mais duas cultivares controles, a soja Brasmax **Soja BÔNUS 8579 RSF IPRO** que possui características de suscetibilidade ao *Meloidogyne incognita* (Sementes Triunfo, 2020) a *Crotalaria spectabilis* que possui resistência ao mesmo (Ferreira, P. S.).

3.7 Instalação do ensaio de fenotipagem e delineamento experimental

O solo escolhido para o experimento foi na proporção 2:1, sendo dois de areia para um de solo argiloso. A escolha de um solo mais arenoso foi devido a facilidade de locomoção e multiplicação do patógeno. O solo foi acondiciona na autoclave por aproximadamente 20 minutos, na temperatura de 120 °C até total esterilização do mesmo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento, sendo a unidade experimental representada por uma planta cultivada em saco plástico (volume de 2 litros). No momento do plantio foi utilizado 1,5 gramas do adubo N-P-K (08 – 20 – 18) e as aplicações de fungicidas e inseticidas foram utilizadas conforme a necessidade.

3.8 Extração do inóculo

O inóculo foi extraído de raízes de tomateiros doados pela Embrapa Arroz e Feijão, de acordo com Bonetti e Ferraz (1981), com algumas modificações que consiste no processamento do sistema radicular infectado em liquidificador com hipoclorito comercial a 2,5% e, em sequência, foi processado por um jogo de peneiras de 20 e 500 mesh, para a obtenção da suspensão de inóculo que é constituída pelos ovos e juvenis retidos na peneira de 500 mesh. A inoculação ocorreu 14 dias após a germinação, em plantas individuais, com uma suspensão com 3000 ovos e

juvenis de segundo estágio (J2) injetada diretamente no solo em três orifícios ao redor do sistema radicular.

3.9 Avaliação

A avaliação foi realizada 45 dias após a inoculação quando pode-se observar a pesagem de massa fresca de raiz (MFR), índice de massa de ovos (IMO), índice de galhas (IG), número de ovos e J2 e calculado o fator de reprodução (FR). O sistema radicular foi lavado em água corrente e deixado para secar, em seguida foi pesado e imerso em solução de floxina B a 0,015 g por 15 minutos, para a coloração das massas de ovos. O IMO e IG foram definidos com o uso de uma escala de nota de 0 a 5: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100, 5 > 100 galhas ou massas de ovos (HARTMAN; SASSER, 1985). O número de ovos e J2 por planta/repetição foi estimado com base na contagem de ovos usando a câmara de Peters ao microscópio ótico. Os FR foram definidos pela razão entre número de ovos e J2 final e o que foi inoculado inicialmente (3000).

3.10 Análise dos dados do bioensaio de fenotipagem

As médias do FR foram transformadas em $\text{Log}_{10}(x+10)$ e após análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott para o nível de significância de 5%. As plantas foram classificadas de acordo com esse teste em AS = altamente suscetível, S = suscetível, MR = moderadamente resistente ou R = resistente (ROBERTS, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios de genotipagem

Dos 26 pares de *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* neste estudo, nove foram caracterizados geneticamente (Tabela 1). Sete destes nove *primers* foram otimizados satisfatoriamente e geraram produto de amplificação de PCR (IFRT02, IFRT03, IFRT06, IFRT15, IFRT25, IFRT26 e IFRT20), sendo os seis primeiros polimórficos e o último monomórfico. Os outros dois (IFRT09 e IFRT11), produziram cada um único produto de amplificação maior que 1 kb, sendo desconsiderados deste trabalho. Exceto pelos locos SSR IFRT09 e IFRT20 que são di-nucleotídeos, os *primers* polimórficos são trinucleotídeos.

Os pares de *primer* microssatélite avaliados neste trabalho destacam-se por ter sido obtidos a partir de sequências de DNA de *P. vulgaris* com mais de 70% de homologia a sequência DNA de sete genes de soja (*Glycine max*) que conferem resistência à nematoide de galha em soja (VIEIRA et al., 2016), conforme a tabela 2. Esse alto poder de transferibilidade e homologia entre espécies distintas como a soja e o feijão comum ocorrem por serem espécies filogeneticamente próximas, uma vez que a transferibilidade de SSR-EST entre espécies afins é elevada em relação aos SSRs genômicos, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho e a indicação de

que os SSR-EST é um dos recursos mais úteis de marcadores moleculares em estudos de genômica (GRUPTA et al., 2003). Estas maiores taxas de amplificação heteróloga podem ser atribuídas ao maior nível de conservação das sequências de DNA pertencentes às regiões transcritas dos genomas, definidas de *EST – Expressed Sequence Tag*).

A partir das análises foi possível observar uma soma de 12 alelos polimórficos foi produzida a partir de seis SSR-EST, sendo estes: (IFRT02, IFRT03, IFRT06, IFRT15, IFRT25, IFRT26 apresentando uma média de dois alelos por loco, com pares de base variando de 194-419 pb, (Tabela 3). A frequência alélica máxima excede 50% em todos os locos SSR-EST avaliados, com exceção do IFRT02, indicando uma distribuição desigual dos alelos e o predomínio de certos alelos no estabelecimento das diferentes cultivares. Essa alta frequência reduziu o poder informativo de determinados locos, constatando um valor médio da diversidade gênica (H_E) de 0,36, variando de 0,10 (loco IFRT03) a 0,50 (loco IFRT26). O valor de H_O ou heterozigidade observada para todos os locos foi zero, o qual foi consistente em 100% de endogamia dos locos estudados indicado pelo valor máximo do índice de fixação (F_{IS}) de 1,00. O H_O e F_{IS} são estimativas da diversidade genética influenciada pelo sistema reprodutivo da espécie ou pelo processo de obtenção das sementes das cultivares, que a exemplo de *P. vulgaris* é predominantemente autógamo (VELOSO, 2014).

Tabela 3: Caracterização de polimorfismos calculados para seis pares de primers entre nove, desenvolvidos para regiões alvos de resistência a *Meloidogyne ssp.* em *Phaseolus vulgaris*. Números de alelos (N_a), heterozigidade esperada (H_e), heterozigidade observada (H_o) e índice de fixação (F), probabilidade de identidade (PI) e probabilidade de exclusão (PE).

Locus	N	Size	Frequência alélica	H_o	H_E (DV)	F	PI	PE
IFRT 03	2	389-419	0,950-0,050	0	0,10 (± 0.6)	1,000	0.82	0.08
IFRT±06	2	194-199	0,600-0,400	0	0,49 (± 0.6)	1,000	0.39	0.27
IFRT 26	2	348-358	0,583-0,417	0	0,50(± 0.6)	1,000	0.38	0.28
IFRT 25	2	182-188	0,800-0,200	0	0,33(± 0.6)	1,000	0.51	0,22
IFRT 02	2	266-270	0,286-0,417	0	0,42(± 0.6)	1,000	0.43	0,25

IFRT 15	2	342-348	0,810-0,190	0	0,32(\pm 0.6)	1,000	0.53	0,21
Média	2	-		0	0,36	1,000		
Total							0.01	0.78

O poder discriminativo dos locos variou de baixo para intermediário, constatando valor de PI por loco de 0,38 (loco IFRT26) a 0,82 (loco IFRT03); e o valor de PE de 0,08 (loco IFRT03) a 0,21 (loco IFRT15) (Tabela 4). Adicionalmente, os valores multilocos de PI e PE foram 0,01 e 0,78, respectivamente. Traduzindo, este valor de PI significa que a probabilidade de selecionar duas cultivares ao acaso como mesmo genótipo, considerando os locos estudados, é de 1 em 100, enquanto PE é a probabilidade de excluir uma cultivar que não é genitora por incompatibilidade alélica nos loci avaliados é de 78%.

A dissimilaridade média estimada através dos seis SSR-ESTs desenvolvidos entre as 26 cultivares de feijão comum estudadas, com valor de 0,38 e variando 0 a 1 (Tabela 4). Com base na análise de agrupamento usando o método de UPGMA foi possível distinguir dois grupos, sendo um grupo constituído por 12 cultivares (circulo vermelho) e outro com 14 cultivares (quadrado azul) (Figura 1). Corroborando com o poder discriminativo dos seis marcadores SSR-EST, constatamos que não foram capazes de separar várias cultivares dentro de cada grupo, os quais correspondem a uma dissimilaridade igual a zero (Tabela 4).

Tabela 4: Matriz de distância calculada a partir da complementação da proporção de alelos comuns ($DG = 1 - ps$) para 26 cultivares de feijão comum a partir da análise de nove *primers* SSR-ESTs.

	ANFCB	Beyer	Uirapuru	C.Gerais	C. Alltech	Estão	UAI	PF	Master1	Master2	CIO	DRK	ALLTECH	FC402	sintopia	Esteio	FC104	C. master	Perola	Tigre	Bolaco	M.perola	Jest	Milênio	Tangara		
Beyer	0,00																										
Uirapuru	0,25	0,00																									
Campos gerais	0,25	0,00	0,00																								
Cajal tech	0,33	0,00	0,00	0,00																							
Estão	0,25	0,20	0,17	0,17	0,20																						
UAI	0,25	0,20	0,17	0,17	0,20	0,00																					
PF	0,25	0,20	0,17	0,17	0,20	0,00	0,00																				
Master1	0,33	0,25	0,20	0,20	0,25	0,40	0,40	0,40																			
Master2	0,25	0,40	0,33	0,33	0,40	0,17	0,17	0,17	0,20																		
CIO	0,67	0,50	0,40	0,40	0,25	0,60	0,60	0,60	0,20	0,40																	
DRK	0,33	0,25	0,20	0,20	0,25	0,40	0,40	0,40	0,00	0,20	0,20																
All tech	0,25	0,20	0,17	0,17	0,20	0,33	0,33	0,33	0,00	0,17	0,20	0,00															
FC 402	0,33	0,25	0,20	0,20	0,25	0,00	0,00	0,00	0,40	0,20	0,60	0,40	0,40														
Sintopia	0,50	0,40	0,33	0,33	0,40	0,17	0,17	0,17	0,60	0,33	0,80	0,60	0,50	0,20													
Esteio	0,00	0,33	0,50	0,50	0,50	0,25	0,25	0,25	1,00	0,50	1,00	1,00	0,75	0,33	0,25												
FC 104	0,33	0,50	0,60	0,60	0,75	0,40	0,40	0,40	0,80	0,60	1,00	0,80	0,80	0,40	0,20	0,00											
C. Master	0,00	0,33	0,50	0,50	0,50	0,25	0,25	0,25	1,00	0,50	1,00	1,00	0,75	0,33	0,25	0,00	0,00										
Perola	0,00	0,00	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	0,67	0,75	0,67	0,67	0,50	0,67	0,50	0,25	0,33	0,25									
Tigre	0,33	0,50	0,60	0,60	0,60	0,40	0,40	0,40	1,00	0,60	1,00	1,00	0,80	0,50	0,20	0,00	0,00	0,00	0,25								
Bolaco	0,50	0,60	0,67	0,67	0,80	0,50	0,50	0,50	0,80	0,67	1,00	0,80	0,83	0,40	0,33	0,25	0,00	0,25	0,50	0,20							
M.perola	0,67	0,50	0,40	0,40	0,50	0,20	0,20	0,20	0,50	0,40	0,75	0,50	0,60	0,00	0,20	0,50	0,25	0,50	0,75	0,50	0,20						
Jest	0,33	0,50	0,60	0,60	0,60	0,40	0,40	0,40	0,75	0,60	0,75	0,75	0,80	0,25	0,60	0,25	0,25	0,25	0,50	0,40	0,20	0,25					
Milênio	0,50	0,25	0,25	0,25	0,33	0,50	0,50	0,50	0,33	0,75	0,67	0,33	0,50	0,33	0,50	0,67	0,33	0,67	0,33	0,67	0,25	0,25	0,33				
Tangara	0,25	0,40	0,50	0,50	0,60	0,33	0,33	0,33	0,60	0,50	0,80	0,60	0,67	0,20	0,50	0,25	0,20	0,25	0,50	0,40	0,17	0,20	0,00	0,25			
Tuiuiu	0,25	0,40	0,50	0,50	0,60	0,33	0,33	0,33	0,60	0,50	0,80	0,60	0,67	0,20	0,50	0,25	0,20	0,25	0,50	0,40	0,17	0,20	0,00	0,25			0,00

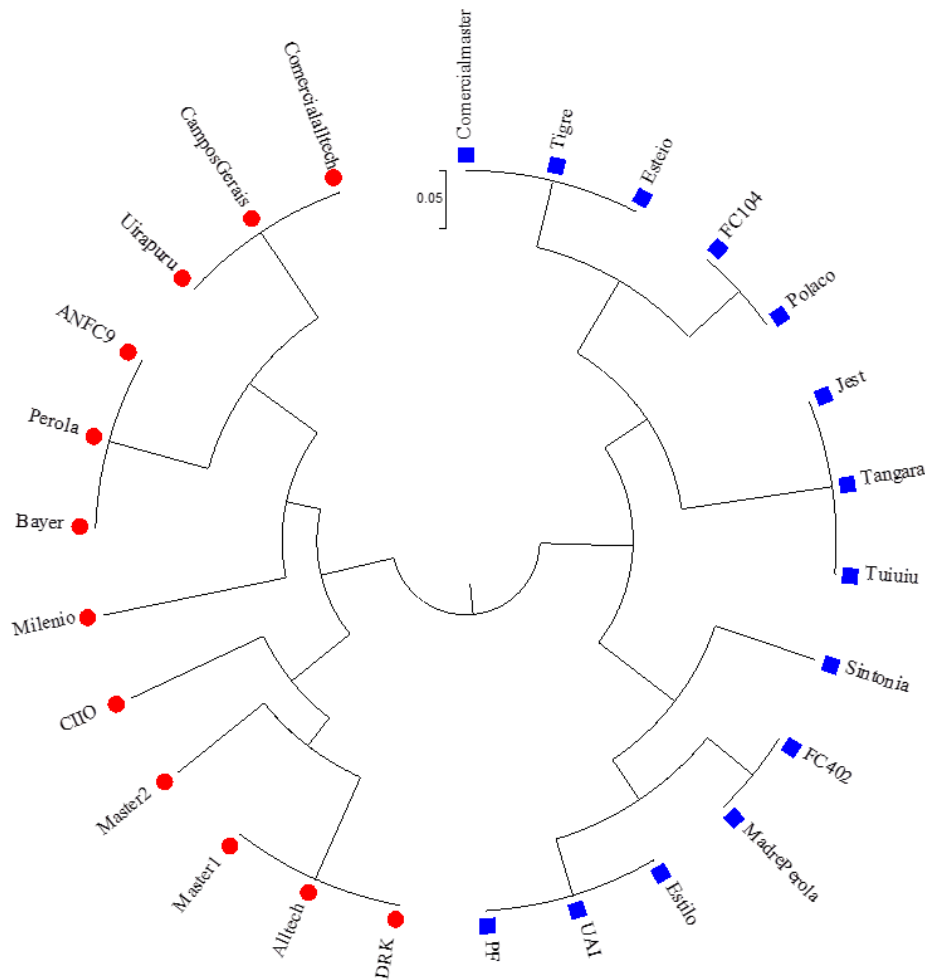


Figura 1: Análise de agrupamento usando o método (UPGMA) dos 26 indivíduos de feijão comum, através de marcadores microssatélites.

Embora esperava-se um baixo nível de polimorfismo em locos EST-SSR de motivos de repetição do tipo trinucleotídico (ELLEGREN, 2004), como corroborado por SANTANA (2014) em estudos feitos com feijão comum; MULLER et al. (2014) demonstraram o contrário revelando os locos SSR (tri-) com maior conteúdo de informação polimórfica entre 34 SSR caracterizados a partir de 88 cultivares de feijão comum Andino e Mesoamericano.

Para CHABANE et al. (2005) o menor polimorfismo quando comparado a sua contraparte genômica deve-se a maior conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas, que também pode produzir índices de fixação mais elevados, uma vez que os marcadores SSR-EST, reduz o caráter polimórfico. Em contrapartida, HANAI et al. (2007)

para um germoplasma de 23 cultivares de feijão comum (Andino e Mesoamericana) constatam uma amplitude alélica maior para os locos SSR-EST (2-12 alelos por loco) quando comparado aos locos SSR-genômicos (2-7 alelos por loco). Desta maneira, podemos afirmar que a baixa quantidade de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos neste trabalho, pode estar associada não apenas em função da região transcrita do genoma da espécie, mas também em relação a base genética do banco de germoplasma utilizado.

Os baixos valores por loco observado podem sugerir a redução da diversidade genética nos programas de melhoramento, devido ao estreitamento da base genética sobre a qual as cultivares e linhagens são selecionados através de um limitado número de parentes geneticamente relacionados. Evidencia de erosão genética foi observada entre ensaios de linhagens avançadas de VCU da Embrapa Arroz e Feijão de 2003/2004 e 2011/2012, em que uma redução de cerca 50% tanto da diversidade genética (0,57 para 0,31) como do número de alelos (7,8 para 4,1) para tipo de grão carioca, respectivamente (CARDOSO et al., 2013). Além do mais, verificou-se uma alta homogeneidade das cultivares de feijão comum entre as instituições de origem, que é provavelmente atribuído ao uso amplo de linhagens CIAT, a partir das quais derivaram as cultivares de feijão dos vários programas institucionais de melhoramento (CARDOSO et al., 2014).

4.2 Ensaios experimentais de fenotipagem

O desenvolvimento desse experimento de fenotipagem, relação hospedeiro e inóculo em *Phaseolus vulgaris*, foi repetido por duas vezes findando os resultados expressos na Tabela 5. Nos mesmos não foram encontrados resultados significativos, no qual todas as cultivares, mesmo o controle suscetível foram determinadas como resistentes. Observamos que haviam nematoides presentes no solo, assim como a formação de galhas, porém os mesmos não conseguiram se multiplicar na raiz, conforme a média do fator de reprodução que obteve valor abaixo de 1, que classificaria os genótipos estudados como resistentes ao *Meloidogyne incognita*.

Tabela 5 : Avaliação de 26 genótipos referente a pesagem de massa fresca da raiz (MFR), índice de massa de ovos (IMO), índice de galhas (IG), número de ovos e J2, fator de reprodução (FR) e relação resistência / suscetibilidade.

GENÓTIPOS	MRF	IMO	IG	OVOS E NEMATÓIDES J2	FR	RELAÇÃO RESISTÊNCIA / SUSCETIBILIDADE
ALL TECH	2,3	0,2	1	312,8	0,142	RESISTENTE
ANFC9	2,8	0,1	2	300	0,05	RESISTENTE
BAYER	1,8	0,2	1,6	50	0	RESISTENTE
C110	2,4	0	0,1	96	0,04	RESISTENTE
CNFC 15097	4,2	0,02	0,8	58,8	0,02	RESISTENTE
COMERCIAL ALL TECH	3,5	0,1	1,6	212	0,09	RESISTENTE
COMERCIAL MASTER	5	0,1	0,6	0,6	0,01	RESISTENTE
BRS ESTEIO	1,5	0,8	1	45,2	0,3	RESISTENTE
BRS ESTILO	1,2	0,4	1,2	50,25	0,04	RESISTENTE
BRS FC 104	1	0,2	0	0	0	RESISTENTE
BRS FC402	1,3	0	0,01	94,8	0,04	RESISTENTE
IPR CAMPOS GERAIS	1,5	0,2	1	0	0	RESISTENTE
JEST	2	0,2	0,1	24	0,008	RESISTENTE
MADRE PEROLA	3,4	0	0,4	24,6	0,01	RESISTENTE
MASTER 1	1	0	0,5	0	0	RESISTENTE
MASTER 2	2	0,25	1,2	0	0	RESISTENTE
IAC MILENIO	1,7	0,2	0,6	0	0	RESISTENTE
PEROLA	2,8	0	0	38,6	0,006	RESISTENTE
PF	1	0,1	0,2	76,6	0,04	RESISTENTE
POLACO	1,8	0,2	1,2	76,6	0,03	RESISTENTE
IAC SINTONIA	2,8	0,7	1,2	24,8	0,01	RESISTENTE
IPR TANGARA	3,3	0,1	1	0	0	RESISTENTE
IAC TIGRE	4	0	0,2	71,2	0,04	RESISTENTE
IPR TUIUIU	2,2	0	0,2	16	0,006	RESISTENTE
BRSMG UAI	1,9	0	0,8	154,8	0,07	RESISTENTE
BRSMG VIRAPURU	1,5	0,5	1	53,4	0,03	RESISTENTE
CROTALARIA	0,3	0	0	0	0	RESISTENTE
SOJA BÔNUS	2	0,5	2,25	153,4	0,06	RESISTENTE

A provável causa dos resultados, pode ser dada ao solo arenoso que foi utilizado no experimento. Segundo Rinaldi et al. (2014), o nematoide *Meloidogyne incognita* se desenvolve melhor em texturas de solos médias, apresentando maior fator de reprodução e índice de galhas. Em contra posição, Peixoto et al. (2010), verificou melhores resultados de índice de reprodução do nematoide de galha na cultura do alface em solos argilosos.

Segundo Baida et al. (2011)., pois observou que todas as cultivares testada em relação a testemunha obtiveram fator de reprodução, índice de massa de ovos e ciclo evolutivo com valores abaixo do esperado, confirmando a hipótese de resistência dessas cultivares ao ataque

de *Meloidogyne* spp. Oliveira et al. (2018), após testar vários genótipos de feijão, observou – se que algumas cultivares apresentaram resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita*, quando o parâmetro de avaliação foi fator de reprodução.

5. CONCLUSÕES

- 1) Seis novos marcadores microssatélites de *P. vulgaris* heterólogos para regiões alvos de genes que conferem resistência genética a nematoide em *Glycine max* estão disponíveis para validação.
- 2) Os locos microssatélites desenvolvidos apresenta uma baixa diversidade gênica no banco de germoplasma utilizado, que indica uma base genética disponível.
- 3) O bioensaio de fenotipagem das 26 cultivares de feijão comum ao nematoide de galha é inconclusivo dada contrariedade do esperado para controle positivo.

6. REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S., B. A. MULLIN and W. F. MAÍ. 2005. Diseases caused by nematodes. **Compendium of bean diseases.** St. Paul: IMPRESA SOCIETU FITOPATOLÓGICA AMERICANA. 2 ed, p. 54-57, 2005.
- ARIANE, R. S. **Transferibilidade e desenvolvimento de sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus* Vogel.** 2014. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás Instituto de Ciências Biológicas em Genética e biologia Molecular, Goiânia.
- BAIDA, F.C.; SANTIAGO, D. C.; TAKAHASHI, L. S. A.; ATHANÁZIO, J. C.; CADIOLI, M. C. E LEVY, R. M.; **Relação de linhagens de feijão – vagem ao *Meloidogyne javanica* e *M. paranaenses* em casa – de- vegetação.** Acta Sci., Agron. , vol.33 n° 2; Maringá ,Abr./Jun. de 2011.
- BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M. P. Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. In: BETTIOL, W.; RIVERA, M.C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE A.; JAIME, R.; COLMENÁREZ, Y. **Control biológico de enfermidades de plantas en América Latina y el Caribe.** Montevideo: University of Uruguay, P.91-138, 2014.
- BOTELHO, C. E.; TASSONE, G. A. U. T.; LIMA, R. R. Caracterização de genótipos de *Coffea arabica* L. em área infestada pelo nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Coffee Science**, Lavras, v.12, n.1, p,1-8, 2016.
- BOWCOCK, A. M., A. RUIZ L., J. TOMFOHRDE, E.; MINCH, J. R. Kidd et al. High resolution of human evolutionary trees With polymorphic microsatellites. *Nature* p.455-457, 1994.
- MINISTÉRIO do Meio Ambiente - MMA, et all. **As consequências do desenvolvimento da agricultura para o meio ambiente Internet. Internet.** Disponível em <www.ecycle.com.br >. Acessado Out 2018.
- CARDOSO, P. C.; BRONDANI, C.; MENEZES, I. P. P; VALDISSER, M, P. A. M. R.; BORBA, T. C. O.; PELOSO, M .J. Del and VIANELLO, R. P. Discrimination of common bean cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics and Molecular Resources**, v. 13, n. 1, p. 1964-1978, 2014.
- CARDOSO, P. C.; VEIGA, M. M; MENEZES, I. P. P; VALDISSER, P. A. M. R; BORBA, T. C; MELO L.; DEL PELOSO, M. J; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Resources**, v. 12, n. 4, p. 5467- 5484, 2013.
- CARNEIRO, R. G.; FERRAZ, S.; REGAZZI, A. J. Estudo de mecanismo de resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em variedades de feijoeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 16, n. 1/2, p. 41-52,1992.

CAROMEL, B.; GEBHARDT, C. Breeding for nematode resistance: use of genomic information. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. New York: Springer Verlag, P.465-492, 2011.

CARVALHO, A. M.; SALGADO, S. M. L.; MENDES, A. N. G.; PEREIRA, A. A.; CARVALHO, S. A. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para regiões alvos de resistência à *Meloidogyne* spp. em *Phaseolus vulgaris***. 2018. Dissertação (Mestrado em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado). Instituto Federal Goiano Campus Urutaí, Urutaí.

CHABANE, K., ABLETT, G. A., CORDEIRO, G. M., WALKMOUN, J., HENRY, R. J. EST versus Genomic Derived Microsatellite Markers for Genotyping Wild and Cultivated Barley. **Genetic Resources And Crop Evolution**, v. 52, n. 7, p.903-909, nov. 2005.

COELHO, J. D. ; Produção de grãos – feijão, milho e soja. **Revista Caderno Setorial ETENE**. Ano 3, Nº 33, Jun. de 2018.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v. 44, n. 4, p. 1121-1131, 2004.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DOYLE, J.J. **Isolamento do DNA da planta do tecido fresco**. Foco, v.12, p.13- 15, 1990.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-455, 2004.

EMBRAPA ARROZ E FEIJAO. Origem e história do feijoeiro comum e do arroz. **Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP)**. Jun., 2000.

Ferraz Júnior AS de LO (2004). Cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do tropico úmido. In Moura EG. (org.). **Agroambientes de Transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. p.71- 100.

FERREIRA, P. S.. **Plantas de cobertura no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica***. Dissertação, UFU. Fev., 2018.

FREITAS, F. DE O. ; Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.7, p.1199-1203, jul. 2006.

GAZZIERO, D. L. P. **Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do brasil**. planta Daninha, Viçosa, v. 33, n. 1, p83-92, 2015.

GONTIJO, L. N. ***Meloidogyne exigua*: Distribuição espacial, nível de infestação, mortalidade de seringueiras e controle com plantas antagonistas**. 2017. Dissertação

(Mestrado em agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GRUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; SHARMA, S.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALYAN, H. S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Mol Genet Genomics**, v. 270, n. 4, p. 315-323, 2003.

HANAI, L. R.; CAMPOS, T.; CAMARGO, L. E. A.; BENCHIMOL, L. L.; SOUZA, A. P.; MELOTTO, M.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; CONSOLI, L.; FORMIGHIERI, E. F.; SIQUEIRA, M. V. B. M.; TSAI, S. M.; VIEIRA, M. L. C. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR *loci* isolated from genic and genomic sources. **Genome**, v. 50, n. 3, p. 266- 277, 2007.
LUZZI, B.; BOERMA, H.; HUSSEY, R. A gene for resistance to the southern root-knot nematode in soybean. **Journal of Heredity**, v. 85, n. 6, p. 484-486, 1994.

MATSUO, E. **Resistência de soja à ferrugem asiática: hibridação, herança e identificação de marcadores microssatélites**. 2012. Dissertação(Genética e melhoramento). Universidade Federal de viçosa, Minas Gerais.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGRICULTURA FAMILIAR. REVISTA, publicado 26/08/2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/agricultura-familiar/agricultura-familiar-1> >, acesso em: 28/12/2019.

MÜLLER, B. S.; SAKAMOTO, T.; DE MENEZES, I. P. P.; PRADO, G. S.; MARTINS, W. S.; BRONDANI, C.; DE BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P. Analysis of BAC end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs. **Biologia Molecular de Plantas**, v. 86, n. 45, p. 455-470, 2014.

OLIVEIRA, C. L. DE; OLIVEIRA, N. S.; OLIVEIRA, M. S. DE; CAMPOS, V. P.; MALUF, W. R. E GOMES, L. A. A.. Reação de genótipos de feijão a *Meloidogyne incógnita* raça 1 e a *Meloidogyne javanica*. **Rev. Ceres**, vol.65, nº 4 , Viçosa, jul./ago. de 2018.

PEAKALL R, SMOUSE PE. GenAlEx 6.5: **genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update**. *Bioinformatics*, 2537–2539, 2012.

PEIXOTO, L. A.; ALVES, F.R.; MORAES, W. B. BELAN, L. L. Quantificação de danos em alface causada por diferentes níveis de *Meloidogyne incognita* em diferentes tipos de solo. Espírito Santo, 2011.

PHAM, A.-T.; MCNALLY, K.; ABDEL-HALEEM, H.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Fine mapping and identification of candidate genes controlling the resistance to southern root-knot nematode in PI 96354. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1825-1838, 2013.

PRUERARI, H. H.; CUNHA, T. P. L.; CHIAMOLERA, F. M.; BIELA, F.; SEVERINO, J. J. E ARIEIRA, C. R. D.; Reação do feijão alado aos nematoides de galha e lesões radiculares. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.1, n.1, p.166-170, 2012.

RINALDI, L. K.; NUNES, J. E MONTECELLI, T. D. N.; Efeito de texturas do solo sobre populações de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* em soja. **Cultivando o Saber**. Volume 7, n.1, p. 83 – 101, 2014.

RIBEIRO, N. R.; SILVA, J. F. V.; MEIRELLES, W. F.; CRAVEIRO, A. G.; PARENTONI, S. N.; SANTOS, F. G. Avaliação da resistência de genótipos de milho, sorgo e milheto a *Meloidogyne javanica* E *M. incognita* raça 3. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.3, p.102-103, 2002.

RUAS, J. F. ; Feijão, dezembro/ 2019. **Análise Mensal, Conab**. Brasília / DF. Dez, 2019.

SALGADO, R.G.; MARINGONI, A. C. E WILCKEN, S.R.S .Não-interação patogênica entre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flavicumfaciens* e *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro. **Nematologia Brasileira**. Vol. 31, p. 202 – 204, Piracicaba / SP ; março, 2007.

SANTINI, L. **Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas**.2014. Dissertação (Genética e melhoramento de plantas). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SANTOS, L. N. S. DOS; CABRAL, P. D. S.; MATTA, F. DE P.; ALVES, F. R.; VALADARES, R. J.; CARO, C. F. E BELAN, L. L.. Comportamento de Genótipos de feijão à *Meloidogyne incognita* raça 3. **Rev. Bras. De Agroecologia**; Vol. 4 No. 2. Nov. 2009.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P. E.; MAMIDI, S.; WU, G. A.; CANNON, S. B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C. A reference genome for common bean and genomewide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p. 707-713, 2014.

SEMENTES TRIUNFO. **Cultivares de Soja, Bônus 8579 RSF IPRO**. Disponível em: <<https://www.sementestriunfo.com.br/cultivares-de-soja/bonus>>. Acesso em : 10/02/2020.

SILVEIRA, P. M.; RAVA, C. A.; Utilização de Crotalária no Controle de Nematóides da Raiz do Feijoeiro. **Comunicado Técnico 74, EMBRAPA**; ISSN 1678-961X ; Santo Antônio de Goiás / GO, Setembro, 2004.

STATISTICAL CONSULTING AND SOFTWARE (STATCON). **Table curve 2d**. 2010.

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L. G.; ASMUS G. L.; INOMOTO, M. M. **Manejo de doenças do algodoeiro**. Circular Técnica, 97, Campina Grande: Embrapa Algodão. p. 7-17, 2006.

VELOSO, J.s. et al. Genetic divergence of common bean cultivars. **Genetics And Molecular Research** v. 14, n. 3, p.11281-11291, 2015.

VIEIRA, L. D. ; SILVA, J. O. ; PEREIRA, C. C. O. ; CARVALHO, S. A. ; SILVEIRA, R. D. D. ; MALAFAIA, G. ; MENEZES, I. P. P. In silico identification of putative expressed sequence tag (EST)-simple sequence repeats (SSRs) markers of resistance to *Meloidogyne* pp.

in common bean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n 23, p. 2007-2012, 2016.

WALBER, R.; JULIATTI, F.; SANTOS, M. Avaliação de acessos de feijoeiro em relação aos nematóides das galhas. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Sociedade Brasileira de Fitopatologia Brasília. p. 293-294, 2003.

WENDLAND, A.; LOBO JUNIOR, M. E FARIA, J. C. DE; **Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro comum**. 1º ed; Brasília, DF ; Embrapa, 2018.

YOKOYAMA, L. Cultivo do feijoeiro comum: importância econômica. **Sistemas de Produção**, v. 2, 2007.

ZHANG, M., MAO, W., ZHANG, G., WU, F. Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley . **Plos One**, China, v. 9, 2014.

